

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-173424

(43)Date of publication of application : 21.06.2002

(51)Int.Cl.

A61K 31/352  
A23L 1/30  
A61K 31/357  
A61K 31/7048  
A61P 1/02  
A61P 1/04  
A61P 3/10  
A61P 9/08  
A61P 9/10  
A61P 17/02  
A61P 19/02  
A61P 19/06  
A61P 19/10  
A61P 27/02  
A61P 29/00  
A61P 31/18  
A61P 35/00  
A61P 35/04  
A61P 43/00  
C12N 9/99  
// C07D311/32  
C07D407/04  
C07H 17/07

(21)Application number : 2000-368242

(71)Applicant : MARUZEN PHARMACEUT CO LTD  
AKISAWA TOSHIFUMI

(22)Date of filing : 04.12.2000

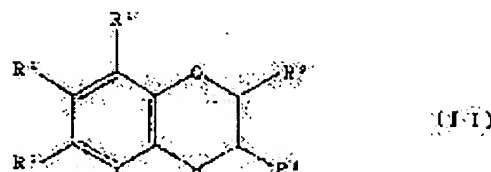
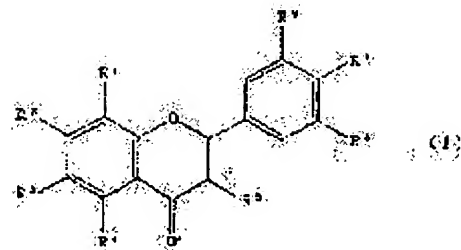
(72)Inventor : AKISAWA TOSHIFUMI  
MIYAKOSHI MASAZUMI  
MIZUTANI KENJI

## (54) MATRIX METALLOPROTEASE INHIBITOR

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a matrix metalloprotease inhibitor useful for treating and/or preventing various kinds of diseases caused by decomposition of extracellular matrix by the matrix metalloprotease.

SOLUTION: This inhibitor comprises a flavanone derivative represented by formula (I) and/or a flavonolignan represented by formula (II) as an active ingredient. The flavanone derivative is a compound selected from the group consisting of aromadendrin, taxifolin, ampelopsin, astilbin, pinobanksin, engeletin, pinocembrin, naringin, naringenin, salipurpin, prunin, sakuranin, sakuranetin, hesperidin, hesperetin, eriodictyol and matteucinol. The flavonolignan is a compound selected from the group consisting of silybin, silychristin, silydianin and isosilybin. This therapeutic and/or prophylactic agent for diseases such as chronic rheumatoid arthritis, arteriosclerosis, osteoarthritis, etc., caused by rise in matrix



BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-173424

(P2002-173424A)

(43) 公開日 平成14年6月21日 (2002.6.21)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 K 31/352

A 6 1 K 31/352

4 B 0 1 8

A 2 3 L 1/30

A 2 3 L 1/30

B 4 C 0 5 7

A 6 1 K 31/357

A 6 1 K 31/357

4 C 0 6 2

31/7048

31/7048

4 C 0 6 3

A 6 1 P 1/02

A 6 1 P 1/02

4 C 0 8 6

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2000-368242(P2000-368242)

(71) 出願人 591082421

丸善製薬株式会社

広島県尾道市向東町14703番地の10

(22) 出願日

平成12年12月4日 (2000.12.4)

(71) 出願人 598174406

秋澤 俊史

大阪府枚方市招提東町1-38-5-401

(72) 発明者 秋澤 俊史

大阪府枚方市招提東町1-38-5-401

(72) 発明者 宮腰 正純

広島県尾道市向東町14703-10 丸善製薬株式会社内

(74) 代理人 100108833

弁理士 早川 裕司 (外1名)

最終頁に続く

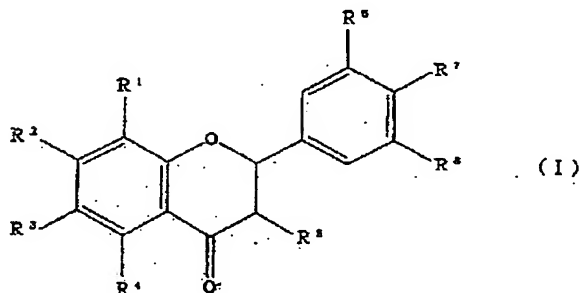
(54) 【発明の名称】 マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤

(57) 【要約】

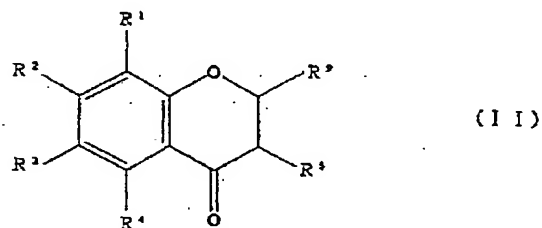
(修正有)

【課題】 新規マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の提供。

【解決手段】 上記阻害剤の有効成分として、フラバノン誘導体、下記式 (I) 及び/又はフラボノリグナン類、下記式 (II) を含有せしめる。フラバノン誘導体が、アロマデンドリン、タキシホリン、アンペロブシン、アスチルビン、ピノバンクシン、エンゲリチン、ピノセンブリン、ナリンギン、ナリンゲニン、サリブルビン、ブルニン、サクラニン、サクラネチン、ヘスベリジン、ヘスベレチン、エリオジクチオール及びマッティシノールからなる群より選択される化合物で、フラボノリグナン類が、シリピン、シリクリスチン、シリジアニン及びイソシリピンからなる群より選択される化合物である上記阻害剤。上記阻害剤によるマトリックスメタロプロテアーゼ活性の上昇に起因する慢性関節リウマチ、動脈硬化、変形性関節症等の疾患の治療剤及び/又は予防剤。



(I)



(II)

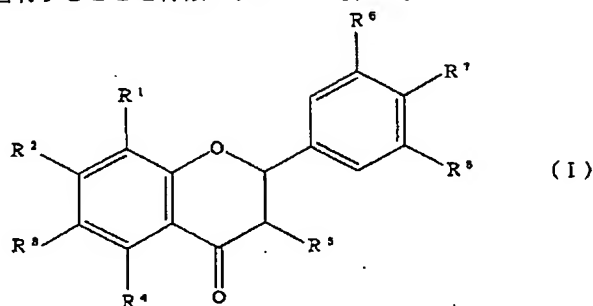
【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラバノン誘導体および／またはフラボノリグナン類を有効成分として含有することを特徴とする\*

\* なるマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項2】 フラバノン誘導体が、一般式（I）：

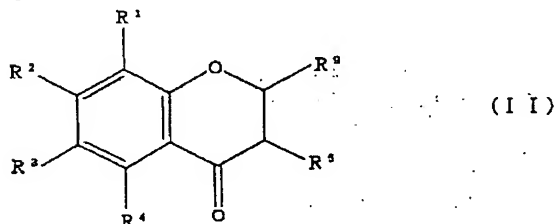
【化1】



【式中、R<sup>1</sup> および R<sup>3</sup> は各々独立して水素原子またはアルキル基を表し、R<sup>2</sup> および R<sup>4</sup> は各々独立して水酸基、アルコキシ基または糖残基を表し、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup> および R<sup>8</sup> は各々独立して水素原子、水酸基、アルコキシ基または糖残基を表す。】で表される化合物であることを特徴とする請求項1記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

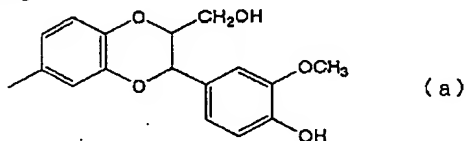
【請求項3】 フラボノリグナン類が、一般式（I）：

【化2】



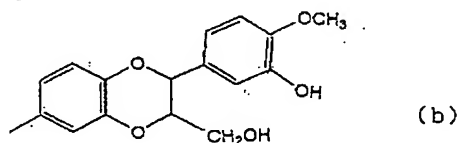
【式中、R<sup>1</sup> および R<sup>3</sup> は各々独立して水素原子またはアルキル基を表し、R<sup>2</sup> および R<sup>4</sup> は各々独立して水酸基、アルコキシ基または糖残基を表し、R<sup>5</sup> は水素原子、水酸基、アルコキシ基または糖残基を表し、R<sup>6</sup> は次式（a）：

【化3】



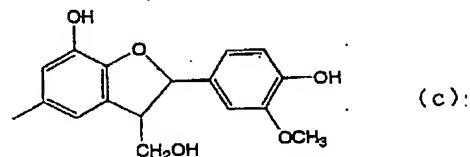
で表される基、次式（b）：

【化4】



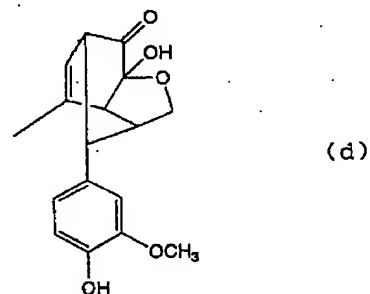
で表される基、次式（c）：

【化5】



20 で表される基、または次式（d）：

【化6】



で表される基を表す。】で表される化合物であることを特徴とする請求項1または2記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項4】 フラバノン誘導体が、アロマデンドリン、タキシホルン、アンペロブシン、アスチルビン、ピノバンクシン、エンゲリチン、ピノセンブリン、ナリンギン、ナリンゲニン、サリプルビン、ブルニン、サクラニン、サクラネチン、ヘスベリジン、ヘスベレチン、エリオジクチオールおよびマッティシノールからなる群より選択される化合物であって、フラボノリグナン類が、シリピン、シリクリスチン、シリジアニンおよびイソシリピンからなる群より選択される化合物であることを特徴とする請求項1記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項5】 マトリックスメタロプロテアーゼ活性の上昇に起因する疾患の治療剤および／または予防剤である請求項1～4のいずれかに記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項6】 前記疾患が、慢性関節リウマチ、動脈硬化、変形性関節症、歯周疾患、異所性脈管形成、腫瘍性

浸潤、腫瘍性転移、潰瘍形成、骨疾患、血管再閉塞、血管再狭窄、HIV感染症または糖尿病合併症であることを特徴とする請求項5記載のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤に関する。また、本発明は、マトリックスメタロプロテアーゼによる細胞外マトリックスの分解によって引き起こされる各種疾患の治療および/または予防に有用なマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteinases) (以下「MMPs」と称する場合がある。)は、細胞外マトリックス(extracellular matrix) (以下「ECM」と称する場合がある。)の構成タンパク質、例えば、関節のライニング(lining)、間質性の結合組織、基底膜、軟骨などに存在するタンパク質(コラーゲン(collagen)、ラミニン(laminin)、エラスチン(elastin)、フィブロネクチン(fibronectin)、プロテオグリカン(proteoglycan)など)の分解および再構築(Remodeling)に関与するタンパク分解酵素群の総称である。

【0003】MMPsはその一次構造と基質特異性の違いから、

①コラゲナーゼ群(MMP-1、MMP-8およびMMP-13)

②ゼラチナーゼ群(MMP-2およびMMP-9)

③ストロメライシン群(MMP-3およびMMP-10)

④膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ(MT-MMP)群(MMP-14、MMP-15、MMP-16およびMMP-17)

⑤その他(マトリライシン(MMP-7)、MMP-11、MMP-12)の5つのグループに分類されている。

【0004】MMPsの共通した性質として、

①活性中心に二価の亜鉛イオンを有し、酵素活性に二価のカルシウムイオンを必要とすること

②潜在型酵素として分泌され、細胞外で活性化を受けること

③アミノ酸配列に高い相同性を有すること

④共通の生体内阻害因子である組織阻害剤(Tissue Inhibitor of Metalloproteinases; TIMPs)によって活性が阻害されることなどが挙げられる。

【0005】正常組織においては、MMPsの活性は、

①潜在型酵素(pro-MMP)の産生

②その潜在型酵素の活性化

③活性化酵素のTIMPsによる制御の3つのステップ

で厳密に調節されており、MMPsによる結合組織の分解と、新しいマトリックス組織の合成とは平衡が保たれている。

【0006】しかしながら、病的条件下ではMMPs活性が上昇し、生体に存在するTIMPsでは制御ができなくなり、ECMの分解が亢進するため、動脈硬化、関節炎(例えば、慢性関節リウマチおよび変形性関節症)、歯周疾患、異所性脈管形成、腫瘍性浸潤、腫瘍性転移、組織の潰瘍形成(例えば、角膜潰瘍、胃潰瘍、表皮性潰瘍)、骨疾患(例えば、骨粗しょう症、人工関節置換術後の弛みなどの骨吸収性疾患)、血管再閉塞、血管再狭窄、HIV感染および糖尿病合併症などの難治性疾患の治療を遅延させる主要な原因の一つとなっている(C.M.Dollery et al., Circ. Res., 77, 863, (1995))。

【0007】したがって、MMPsに対して阻害作用を有する物質は、これら難治性疾患の予防および治療剤として有用であると考えられる。とりわけ、がん細胞の組織浸潤・転移の際にECMの分解に関与するMMPsの役割は重要(R.P.Beckett et al., D.D.T., 1, 16, (1996))であり、MMPsの作用を阻害する物質は、ガンの浸潤・転移を抑制する薬剤として有望である。

【0008】このように病的条件下におけるMMPs活性の上昇をMMPs阻害剤により制御することは有用であり、各種のMMPs阻害剤について総説が報告されている(R.P.Beckett et al., D.D.T., 1, 16, (1996))。特に、血管新生の阻害やMMPsの活性化の阻害によるガン転移治療薬として、ヒドロキサム酸骨格をもつマリマスタット(3R-(2,2-ジメチル-1S-メチルカルバモイル-プロピルカルバモイル)-2S-ヒドロキシ-5-メチル-ヘキサノ-ヒドロキサム酸)を始めとして、いくつかの抗転移薬剤が臨床開発中である。

【0009】しかしながら、これらの抗腫瘍転移抑制剤は、腫瘍細胞の生物学的特徴を標的にしているので、抗がん剤のように、直接的に病巣の縮小効果が認められないため、抗がん剤の評価基準をそのまま適応して判断するのが難しく、その有用性の臨床評価方法が検討途中である。

【0010】その他、MMPs阻害剤としては、フラボン類およびアントシアニン(特開平8-104628号公報)、エスクレチン誘導体(特開平8-183785号公報)、スルフォニルアミノ酸誘導体(特開平9-309875号公報)、TIMPs(特開平10-17492号公報)などが知られているが、活性、体内での吸収、毒性などを考慮すると、新しいMMPs阻害剤が望まれる。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明は、新たなマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤を提供することを目的とする。

【0012】

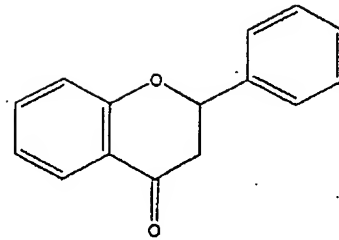
【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤は、フラバノン誘導体および／またはフラボノリグナン類を有効成分として含有することを特徴とする。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤（以下「MMPs阻害剤」と称する場合がある。）の有効成分は、フラバノン誘導体および／またはフラボノリグナン類である。すなわち、本発明のMMPs阻害剤の有効成分としては、フラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を単独で、あるいは両者を組み合わせて使用する。

【0014】本発明において、「フラバノン誘導体」とは、2-フェニルクロマノン骨格、すなわち次式：

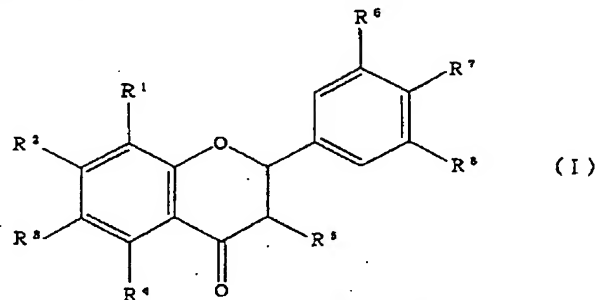
\*【化7】



10 で表される骨格を有する化合物を意味する。

【0015】本発明のMMPs阻害剤の有効成分として使用するフラバノン誘導体は、MMPs活性阻害作用を有する限り特に限定されないが、好ましいものとして、一般式（I）：

\*【化8】



(I)

【式中、R<sup>1</sup> および R<sup>3</sup> は各々独立して水素原子またはアルキル基を表し、R<sup>2</sup> および R<sup>4</sup> は各々独立して水酸基、アルコキシ基または糖残基を表し、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup> および R<sup>8</sup> は各々独立して水素原子、水酸基、アルコキシ基または糖残基を表す。】で表される化合物を例示することができる。

【0016】一般式（I）において、R<sup>1</sup> または R<sup>3</sup> で表されるアルキル基は特に限定されるものではないが、好ましくは炭素数1～5の直鎖状または分岐鎖状のアルキル基である。その具体例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、s-ブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、t-ペンチル基、ネオペンチル基などが挙げられるが、その中でも特にメチル基が好ましい。

【0017】一般式（I）において、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup> または R<sup>8</sup> で表されるアルコキシ基は特に限定されるものではないが、好ましくは炭素数1～4の直鎖状または分岐鎖状のアルコキシ基である。その具体例としては、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブトキシ基、s-ブトキシ基、t-ブトキシ基などが挙げられるが、その中でも特にメトキシ基が好ましい。

【0018】一般式（I）において、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup> または R<sup>8</sup> で表される糖残基は特に限定されるものではなく、単糖類であってもよいし、二糖

類、三糖類、四糖類などの少糖類であってもよい。また、少糖類は、還元性少糖類であってもよいし、非還元性少糖類であってもよい。

【0019】単糖類の具体例としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、タロース、ソルボース、タガトース、ブシコースなどのヘキソース、キシロース、アラビノース、リボース、リキソース、リブロース、キシロロースなどのペントースが挙げられる。これらの単糖類が有する水酸基は、水素原子、アミノ基などで置換されていてもよいし、糖に含まれる酸素原子のいずれかが硫黄原子によって置換されていてもよいし、アルドースの場合にはその炭素鎖末端のヒドロキシメチル基がカルボキシル基に酸化されていてもよい。

【0020】水酸基が水素で置換された糖、すなわち、デオキシ糖の具体例としては、マンノースの6位炭素原子上の水酸基が水素に置換されたラムノース（6-デオキシマンノース）、ガラクトースの6位炭素原子上の水酸基が水素に置換されたフコース（6-デオキシガラクトース）が挙げられる。

【0021】水酸基がアミノ基に置換された糖、すなわち、アミノ糖の具体例としては、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルノイラミン酸などが挙げられる。

【0022】酸素原子のいずれかが硫黄原子によって置換された糖、すなわち、チオ糖の具体例としては、1-チオ-D-グルコースなどが挙げられる。

【0023】アルドースの炭素鎖末端のヒドロキシメチル基がカルボキシル基に酸化された糖、すなわち、ウロン酸の具体例としては、グルクロン酸、ガラクトロン酸、マンヌロン酸、イズロン酸などが挙げられる。

【0024】少糖類の具体例としては、1種または2種以上の単糖類分子がグリコシド結合したものが挙げられ、例えば、二糖類の具体例としては、キシロビオース、トレハロース、レバンビオース、キトビオース、2-β-グルクロノシルグルクロン酸などのホモ二糖、スクロース、ラクトース、ピシアノース、サンブビオース、メリビオース、エビセロビオース、ツラノース、ラクツロースなどのヘテロ糖が挙げられ、三糖類の具体例としては、ラフィノース、ウンペリフェロースなどが挙げられ、四糖類の具体例としては、スタキオースなどが挙げられる。

【0025】少糖類を構成する単糖類分子はデオキシ糖、メチル糖、アミノ糖、チオ糖、ウロン酸などであってもよく、例えば、デオキシ糖を含む二糖類の具体例としては、ルチノース、ロビノビオースなどが挙げられ、アミノ糖を含む二糖類の具体例としては、トレハロサミンなどが挙げられ、ウロン酸を含む二糖類の具体例としては、セロビオウロン酸などが挙げられる。

【0026】一般式(I)において、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ または $R^8$ で表される糖残基と非糖部との結合様式は特に限定されないが、通常、糖残基は非糖部の水酸基を介して非糖部とエーテル結合している。その他の結合様式としては、例えばチオグリコシド結合などが挙げられる。

【0027】一般式(I)で表されるフラバノン誘導体の具体例としては、以下に示すフラバノール類およびフラバノン類が挙げられる。

#### 【0028】[フラバノール類]

アロマデンドリン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ および $R^7$ が水酸基である化合物)

タキシホリン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ および $R^6$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^7$ が水酸基である化合物)

アンペロブシン(一般式(I)において、 $R^1$ および $R^3$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ および $R^8$ が水酸基である化合物)

アスチルビン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ および $R^6$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ および $R^7$ が水酸基であり、 $R^8$ がラムノース残基( $-O-C_6H_4O_4$ )である化合物)

ビノバンクシン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ および $R^5$ が水酸基である化合物)

エンゲリチン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ および $R^7$

が水酸基であり、 $R^5$ がラムノース残基( $-O-C_6H_4O_4$ )である化合物)

#### 【0029】[フラバノン類]

ビノセンブリン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ および $R^4$ が水酸基である化合物)

ナリンギン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^4$ および $R^7$ が水酸基であり、 $R^2$ がグルコース-ラムノース残基( $-O-C_{12}H_{21}O_6$ )である化合物)

ナリンゲニン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ および $R^7$ が水酸基である化合物)

サリブルピン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ および $R^7$ が水酸基であり、 $R^4$ がグルコース残基( $-O-C_6H_4O_5$ )である化合物)

ブルニン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^4$ および $R^7$ が水酸基であり、 $R^2$ がグルコース残基( $-O-C_6H_4O_5$ )である化合物)

サクラニン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^7$ が水酸基であり、 $R^2$ がメトキシ基であり、 $R^4$ がグルコース残基( $-O-C_6H_4O_5$ )である化合物)

サクラネチン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^4$ および $R^7$ が水酸基であり、 $R^2$ がメトキシ基である化合物)

ヘスベリジン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^4$ および $R^6$ が水酸基であり、 $R^2$ がグルコース-ラムノース残基( $-O-C_{12}H_{21}O_6$ )であり、 $R^7$ がメトキシ基である化合物)

ヘスベレチン(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ および $R^6$ が水酸基であり、 $R^7$ がメトキシ基である化合物)

エリオジクチオール(一般式(I)において、 $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^6$ および $R^7$ が水酸基である化合物)

マッティシノール(一般式(I)において、 $R^5$ 、 $R^6$ および $R^8$ が水素原子であり、 $R^2$ および $R^4$ が水酸基であり、 $R^1$ および $R^3$ がメチル基であり、 $R^7$ がメトキシ基である化合物)

【0030】本発明のMMPs阻害剤の有効成分としては、これらのフラバノン誘導体の中から、1種の化合物を選択してもよいし、2種以上の化合物を選択してもよい。

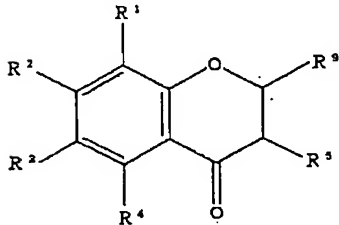
【0031】本発明において、「フラボノリグナン類」とは、2-フェニルクロマノン骨格にコニフェリルアルコールが種々の酸化結合したもの(すなわちフラボノリ

9

グナン（化学式  $C_{25}H_{22}O_{10}$ ）またはその誘導体を意味する。

【0032】本発明の MMPs 阻害剤の有効成分として使用するフラボノリグナン類は、MMPs 活性阻害作用を有する限り特に限定されないが、好ましいものとして、一般式 (I I) :

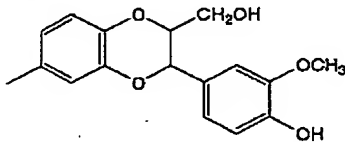
【化9】



(I I)

〔式中、 $R^1$  および  $R^3$  は各々独立して水素原子またはアルキル基を表し、 $R^2$  および  $R^4$  は各々独立して水酸基、アルコキシ基または糖残基を表し、 $R^5$  は水素原子、水酸基、アルコキシ基または糖残基を表し、 $R^6$  は次式 (a) :

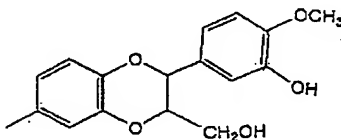
【化10】



(a)

で表される基、次式 (b) :

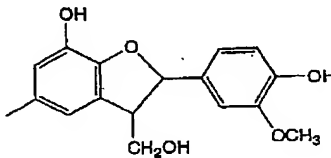
【化11】



(b)

で表される基、次式 (c) :

【化12】

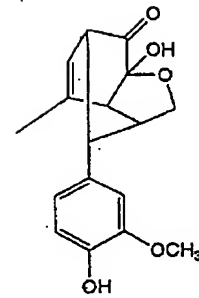


(c):

で表される基、または次式 (d) :

【化13】

10



(d)

10 で表される基を表す。〕で表される化合物を例示することができる。

【0033】一般式 (I I) において、 $R^1$  または  $R^3$  で表されるアルキル基、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$  または  $R^8$  で表されるアルコキシ基または糖残基は、一般式 (I) におけるものと同義であり、その具体例としては前記と同様のものが挙げられる。

【0034】一般式 (I I) で表されるフラボノリグナン類の具体例としては、以下に示すフラボノリグナンが挙げられる。

20 【0035】【フラボノリグナン】

シリピン（一般式 (I I) において、 $R^1$  および  $R^3$  が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$  および  $R^5$  が水酸基であり、 $R^6$  が前記式 (a) で表される基である化合物）

イソシリピン（一般式 (I I) において、 $R^1$  および  $R^3$  が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$  および  $R^5$  が水酸基であり、 $R^6$  が前記式 (b) で表される基である化合物）

シリクリスチン（一般式 (I I) において、 $R^1$  および  $R^3$  が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$  および  $R^5$  が水酸基であり、 $R^6$  が前記式 (c) で表される基である化合物）

30 シリジアニン（一般式 (I I) において、 $R^1$  および  $R^3$  が水素原子であり、 $R^2$ 、 $R^4$  および  $R^5$  が水酸基であり、 $R^6$  が前記式 (d) で表される基である化合物）

【0036】本発明の MMPs 阻害剤の有効成分としては、これらのフラボノリグナン類の中から、1種の化合物を選択してもよいし、2種以上の化合物を選択してもよい。

【0037】本発明の MMPs 阻害剤の有効成分として使用するフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類は、フラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を含有する植物から抽出することができる。

【0038】フラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を含有する植物の具体例としては、伊豆縮砂 (Alpinia japonica)、コノテガシワ (Biota orientalis)、ハゼノキ (Rhus succedanea)、黄柏 (Phellodendron amurense)、ヒノキ (Chamaecyparis obtuse)、藤茶 (Amelopsis grossedentata)、黄杞 (Engelhardtia chrysolepis)、マリアアザミ (Silybum marianum) などが挙げられる。

50 【0039】例えば、フラバノン誘導体のうち、「アロ

マデンドリン」は、カツラ (*Cercidiphyllum japonicum*)、欧州カラマツ (*Larix decidua*)、モモ (*Prunus persica*) などの材に含まれ、「タキシホリン」は、ダグラスファー (*Pseudotsuga Douglasii*)、カラマツ (*Larix leptolepis*)、イスノキ (*Distylium racemosum*)、ヒザクラ (*Prunus Campanulata*) などの材に含まれ、「アンペロブシン」は、*Ampelopsis meliaefolia*の葉、*Pinus contorta*の樹皮などに含まれ、「アスチルビン」は、トリアシショウマ (*Astilbe odontophylla*) の根茎などに含まれ、「ピノバンクシン」は、ヒマラヤゴヨウ (*Pinus excelsa*)、ストロブマツ (*Pinus strobus*) などのマツ類の心材に含まれ、「エンゲリチン」は、フジバシデ (*Engelhardtia formosana*) の樹皮などに含まれ、「ピノセンブリン」は、チョウセンゴヨウ (*Pinus koraiensis*)、ストロブマツ (*Pinus strobus*)、ヒマラヤゴヨウ (*Pinus excelsa*) などのマツ類の心材などに含まれ、「ナリンギン」は、*Citrus grandis*などのザボン類の花などに含まれ、「ナリンゲニン」は、*Citrus decumana*などのザボン類の花に含まれ、「サリブルピン」は、ヤナギの一種であるpurple willow (*Salix purpurea*) の樹皮などに含まれ、「ブルニン」は、ソメイヨシノ (*Prunus yedoensis*) などのサクラの材に含まれ、「サクラニン」は、ソメイヨシノ (*Prunus yedoensis*) やオオシマザクラの樹皮などに含まれ、「サクラネチン」は、ソメイヨシノ (*Prunus yedoensis*) やオオシマザクラの樹皮などに含まれ、「ヘスベリジン」は、ミカン、ボンカン、ネーブル、オレンジ、レモンなどの外果皮に含まれ、「ヘスベレチン」は、ミカン、ボンカンなどのミカン属 *Citrus* の外果皮に含まれ、「エリオジクチオール」は、ハギ (*Lespedeza bicolor*)、マルバハギ (*Lespedeza cyrtobotrya*) の葉などに含まれ、「マッティシノール」は、シダ類イヌガンソウ (*Matteuccia orientalis*) の葉柄などに含まれる。

【0040】また、例えば、フラボノリグナン類のうち、「シリピン」、「イソシリピン」、「シリジアニン」および「シリクリスチン」は、キク科のオオヒレアザミ (*Silybum marianum*) の種子などに含まれる。

【0041】フラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を含有する植物からのフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類の抽出は、抽出溶媒として、例えば極性溶媒を使用して行なうことができる。好適な極性溶媒の具体例としては、水 (好ましくは精製水)、低級脂肪族アルコール、含水の低級脂肪族アルコールなどを例示でき、これらを単独で、又はこれらの2種類以上の混合物として使用することができる。好適な低級脂肪族アルコールの具体例としては、メタノール、エタノール、プロパノール、1,3-ブチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールなどを例示することができる。

【0042】抽出処理は、植物に含まれるフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を抽出溶媒に溶出させ得

る限り特に限定されず、常法に従って行なうことができる。この際、抽出温度、抽出時間などの抽出条件は、フラバノン誘導体またはフラボノリグナン類の安定性を考慮して、当業者が適宜設定することができる。

【0043】フラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を含有する抽出液は、そのまま本発明のMMPs阻害剤の有効成分とすることができるが、該抽出液の希釈液もしくは濃縮液、該抽出液を乾燥して得られる乾燥物、またはこれらの粗精製物もしくは精製物を本発明のMMPs阻害剤の有効成分とすることもできる。本発明のMMPs阻害剤の有効成分としては、分画、Kasaiらの方法 (Kasai, R. et al.: Chem. Pharm. Bull. 36:4167-4170 (1988)) などによって精製したフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を使用することが好ましい。Kasaiらの方法によれば、植物からフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を抽出した後、脱脂処理 (エーテル抽出による脂溶性成分の除去)、多孔性樹脂による処理 (主として化合物の極性による分離)、再結晶 (溶媒に対する溶解度による分離)、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる処理 (分離)、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) による処理 (精製) を順次行なうことにより、植物から抽出したフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を精製することができる。

【0044】本発明のMMPs阻害剤の有効成分としては、常法に従って化学合成したフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類を使用してもよいし、これらの化合物を成分として含む生薬エキスを使用してもよい。また、本発明のMMPs阻害剤の有効成分としては、フラボノリグナン類としてシリマリンを使用してもよい。なお、シリマリン (「シリマリンエキス」とも呼ばれる。) は、キク科のオオヒレアザミ (*Silimum marianum*) の種子から抽出されたエキスであり、シリピン、イソシリピン、シリジアニン、シリクリスチンなどのフラボノリグナン類が含まれている。

【0045】本発明のMMPs阻害剤は、フラバノン誘導体および/またはフラボノリグナン類そのものであってもよいが、薬学的に許容され得る担体または希釈剤と共に製剤化することが好ましい。製剤化の際には、結合剤、吸収促進剤、滑沢剤、乳化剤、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤、着色剤、香料、甘味料などを添加することができる。製剤中の有効成分の割合は、MMPs活性を阻害し得る範囲内で適宜決定し得るが、好ましくは0.1~10重量%であり、さらに好ましくは0.5~1.0重量%である。剤形としては、顆粒剤、細粒剤、錠剤、カプセル剤、丸剤、軟膏、ゲル、ペースト、クリーム、噴霧剤、溶液剤、懸濁液剤などが挙げられる。

【0046】本発明のMMPs阻害剤の投与経路としては、経口投与の他、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、関節・腔などの非経口投与など、種々の投与経路が挙げられる。本発明のMMPs阻害剤の投与量は、有効

10

20

30

40

50



成分であるフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類の量に換算して、通常一日あたり0.1~500mg/kg(体重)、好ましくは0.5~200mg/kg(体重)である。1日量を1回から数回程度投与することができるが、投与量および投与頻度は、年齢、性別、個人差、病状、投与経路などに応じて適宜変更することができる。

【0047】本発明のMMPs阻害剤は、経口投与が可能なので、例えば、食品に添加し、それを摂取させてもよい。ここで、「食品」とは、栄養素を1種以上含む天然物および加工品を言い、あらゆる飲食物を含む。本発明のMMPs阻害剤を添加し得る食品の具体例としては、チョコレート、ビスケット、飴菓子などの菓子類、ジュースなどの清涼飲料、牛乳、ヨーグルトなどの乳酸飲料などが挙げられる。

【0048】本発明のMMPs阻害剤は、MMPsの活性を阻害することができる。本発明のMMPs阻害剤が活性を阻害し得るマトリックスメタロプロテアーゼの種類は特に限定されないが、本発明のMMPs阻害剤は特にMMP-7に対して優れた阻害作用を有している。

【0049】生体内におけるMMPs活性の上昇(例えばMMPs活性調節不能によるMMPs活性の上昇)は種々の疾患に関与しているので、本発明のMMPs阻害剤はMMPs活性の上昇に起因する種々の疾患の予防剤および/または治療剤として有用であると考えられる。

【0050】すなわち、MMPs活性が上昇すると、ECMの分解が亢進し、これが、動脈硬化、関節炎(例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症)、歯周疾患、異所性脈管形成、組織の潰瘍形成(例えば、角膜潰瘍、胃潰瘍、表皮性潰瘍)、骨疾患(例えば、骨粗鬆症、人工関節置換術後の弛みなどの骨吸収性疾患)、血管再閉塞、血管再狭窄、HIV感染、糖尿病合併症などの難治性疾患の治療を遅延させている主要な原因の一つとなっている。特に、MMP-7は、上皮性のがん細胞である大腸がんや胃がんで特異的に発現が亢進していることが報告されており(Mori, M. et al.: Cancer, 75: 1516-1519, 1995; Kataoka, H.: Oncol. Res. 9:101-109, 1997)、がんの組織浸潤・転移に関与していると考えられる。したがって、本発明のMMPs阻害剤によれば、MMPs活性を阻害することにより、MMPs活性の上昇に起因する上記疾患を予防および/または治療することができると考えられる。

【0051】特に、本発明のMMPs阻害剤はMMP-7に対して優れた阻害作用を有しているので、MMP-7活性を阻害することにより、MMP-7が関与するがんの組織浸潤・転移を抑制することが期待され、抗腫瘍転移薬として有用であると考えられる。

【0052】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるもの

ではない。

【0053】〔実施例1〕

(1) MMP-7の調製

マトリライシン(MMP-7)のcDNA(Nagase, H.: Biol. Chem., 378: 151-160, 1997; Sato, H. et al.: Nature, 370: 61-65, 1994; Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 4: 197-250, 1993)を、発現ベクターpTH-72に導入し、C末端にヒスチジン6残基を持つ組換え潜在型酵素(ProMMP)を、大腸菌大量発現系を用い発現させた後、活性化した。なお、発現ベクターpTH-72は、タンデムリピートのT7プロモーターの下流に、リボソーム結合部位、翻訳開始コドン、マルチクロニング部位、ヘキサヒスチジンタグをコードする配列、および翻訳終止コドンを含んでいる。

【0054】ヒトMMP-7は、Itohらの方法(Itoh, M. et al.: J. Biolchem., 119: 667-673, 1996)に従って発現させた。また、ヒト組換えMMPsの発現、精製、および巻き戻し(リフォールディング; refolding)は、公知の方法(西村義文、大野茂雄 監修: タンパク実験プロトコール、細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ2 構造解析編、1997)に準じて行なった。

【0055】すなわち、マトリライシン(MMP-7)のcDNAを含む発現ベクター(pTH-MMP-7)を、大腸菌B132(DE3)株にトランスフェクトし、IPTGで発現誘導した。発現タンパクは、Ni-NTA樹脂(QIAGEN INC., USA)を用いてアフィニティー精製後、リフォールディングを行ない、トリブシンと37℃、5分間反応後、DIFP(diisopropylphosphorofluoridate)とトリブシン阻害剤(Tris-HCl 150mM, NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, NaN<sub>3</sub> 0.02%, Brij35 0.05%)を加えることにより活性型へ移行させた。これを酵素標本とし、蛍光性ペプチド基質(MOCAC/DNP peptide)切断活性反応を行ない、蛍光マイクロプレートリーダー(励起波長: 340nm、蛍光波長: 400nm)による蛍光強度を測定し、これを酵素活性の指標とした。

【0056】(2) フラバノン誘導体またはフラボノリグナン類のMMPs阻害活性の測定

フラバノン誘導体としては、タキシホリン(化合物1)、アスチルビン(化合物2)、アンペロブシン(化合物3)を使用し、フラボノリグナン類として、シリクリスチン(化合物4)、シリジアニン(化合物5)、シリピン(化合物6)を使用した。なお、フラバノン誘導体として使用した化合物1~3の構造を図1に、フラボノリグナンとして使用した化合物4~6の構造を図2示す。

【0057】フラバノン誘導体またはフラボノリグナン類は、0.05%エタノールに溶解させて0.1mg/mLとした後、水で、0.075mg/mL、0.05mg/mL、0.025mg/mL、0.01mg/mLに希釈した。MMP-7阻害活性の測定は、活性型

MMP-7 40 $\mu$ L、フラバノン類またはフラボノリグナン類 30 $\mu$ L、アッセイバッファー20 $\mu$ L (Tris-HCl (pH 7.5)、500mM NaCl 1.5M、CaCl<sub>2</sub> 100mM、ZnSO<sub>4</sub> 500 $\mu$ M、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 30mM Brij35 0.05%) を、37℃で15分間ブレインキュベーションした後、MOCAC/DNP peptide 120 $\mu$ L (4.16 $\mu$ M) を添加し、37℃で15分毎に観察し \*

[表1]

化合物No.	化合物名	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
1	タキシホリン	0.029
2	アスチルビン	0.028
3	アンペロブシン	0.011
4	シリクリスチン	0.042
5	シリジアニン	0.026
6	シリピン	0.074

【0059】表1に示すように、化合物1～6のフラバノン誘導体またはフラボノリグナン類は濃度依存的にMMPs活性阻害作用を示すことが確認された。しかも、いずれも極めて低濃度で優れたMMPs活性阻害作用を示すことが確認された。

【0060】

【発明の効果】本発明により、フラバノン誘導体および/またはフラボノリグナン類を有効成分として含有することを特徴とするマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤 (MMPs阻害剤) が提供される。本発明のMMPs阻害剤は、MMPsに対して優れた阻害作用を有する。本発明のMMPs阻害剤は、MMPs活性が関与する疾患、例えば、動脈硬化症、関節炎 (例えば、慢性関節リ

ウマチ、変形性関節症)、歯周疾患、異所性脈管形成、腫瘍性浸潤、腫瘍性転移、組織の腫瘍形成 (例えば、角膜腫瘍、胃潰瘍、表皮潰瘍)、骨疾患 (例えば、骨粗鬆症、人工関節置換術後の弛みなどの骨吸収性疾患)、血管再閉塞、血管再狭窄、HIV感染、糖尿病合併症など

【0058】

の治療剤および/または予防剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例で使用したフラバノン誘導体 (タキシホリン (化合物1)、アスチルビン (化合物2)、アンペロブシン (化合物3)) の構造を示す図である。

【図2】実施例で使用したフラボノリグナン類 (シリクリスチン (化合物4)、シリジアニン (化合物5)、シリピン (化合物6)) の構造を示す図である。

【図1】

## フラバノン誘導体

化合物	構造
化合物1 タキシホリン	
化合物2 アスチルビン	
化合物3 アンペロブシン	

【図2】

## フラボノリグナン類

化合物	構造
化合物4 シリクリスチン	
化合物5 シリジアニン	
化合物6 シリピン	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 P 1/04

A 6 1 P 1/04

3/10

3/10

9/08

9/08

9/10

9/10

17/02

17/02

19/02

19/02

19/06

19/06

19/10

19/10

27/02

27/02

29/00

29/00

31/18

31/18

35/00

35/00

35/04

35/04

43/00

43/00

C 1 2 N 9/99

C 1 2 N 9/99

// C 0 7 D 311/32

C 0 7 D 311/32

407/04

407/04

C 0 7 H 17/07

C 0 7 H 17/07

(72)発明者 水谷 健二  
広島県尾道市向東町14703-10 丸善製薬  
株式会社内

F ターム(参考) 4B018 MD08 MD42 MD48 ME03 ME07  
ME08 ME09 MF01  
4C057 AA06 AA09 BB02 DD01 KK08  
4C062 EE54  
4C063 AA01 BB01 CC79 CC82 DD76  
DD79 EE01  
4C086 AA01 AA02 BA08 BA15 EA11  
GA02 MA01 MA04 MA52 NA14  
ZA33 ZA39 ZA45 ZA67 ZA68  
ZA89 ZA96 ZA97 ZB11 ZB15  
ZB26 ZC35 ZC55

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**